

DNA マイクロアレイ法を用いたグルコサミン塩酸塩 およびN-アセチルグルコサミン摂取における マウス肝臓の遺伝子発現解析

中谷祥恵, 真野 博, 古旗賢二, 和田政裕

城西大学薬学部薬科学科機能性食品科学

Nutrigenomic Approaches to Study the Effects of Glucosamine
Hydrochloride and N-acetyl Glucosamine on the Liver in C57BL/6J Mice

SACHIE NAKATANI, HIROSHI MANO, KENJI FURUHATA, MASAHIRO WADA

Department of Pharmaceutical Technochemistry, Josai University

グルコサミン研究 4
2008 年9月発行 別刷

Reprinted from
Glucosamine Research 4

DNA マイクロアレイ法を用いたグルコサミン塩酸塩およびN-アセチルグルコサミン摂取におけるマウス肝臓の遺伝子発現解析

Nutrigenomic Approaches to Study the Effects of Glucosamine Hydrochloride and N-acetyl Glucosamine on the Liver in C57BL/6J Mice

中谷祥恵, 真野 博, 古旗賢二, 和田政裕

Sachie NAKATANI, Hiroshi MANO, Kenji FURUHATA, Masahiro WADA

要 旨

D-グルコサミン塩酸塩 (GlcN) および N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) は変形性関節症などの関節機能障害の改善に有用であるとされ, 現在, 健康食品として広く利用されている。われわれは, 以前, 軟骨細胞を用いた *in vitro* の研究において, GlcN は軟骨細胞の増殖には影響を与えず, アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を抑制するが, GlcNAc は軟骨細胞の増殖および ALP 活性に影響を与えないことを報告している。この結果は, GlcN および GlcNAc は, 生体内における生理作用が異なる可能性を示唆している。われわれは GlcN および GlcNAc の摂取がマウス肝臓の遺伝子発現に与える影響を, DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析し, 両分子の共通点および相違点を検討した。

10 週齢 C57BL/6J 雄性マウスに 0.02% の GlcN および GlcNAc を 3 週間摂取後, 肝臓の total RNA を抽出し, DNA マイクロアレイ解析を用いて遺伝子発現レベルを検討した。コントロールとして D-グルコース (Glc) を用いた。その結果, 16,157 の転写産物中, GlcN および GlcNAc 共通で発現が変動したものは, 1,064 個検出された。GlcN 特異的に発現が変動したものは, 2,179 個であった。一方, GlcNAc 特異的に発現が変動したものは, 1,856 個であった。GlcN および GlcNAc 共通に発現レベルが増加した遺伝子として GFAT, TIMP-1, TIMP-2 があった。GlcN 特異的に発現が変動した遺伝子として, Hsd17b1 および Hsd17b3 を見出した。さらに, GlcNAc 特異的に発現が変動した遺伝子として, c-Fos を見出した。

本研究の結果, GlcN と GlcNAc の摂取後における生理作用は, 異なる点があることを遺伝子レベルで明らかにした。GlcN および GlcNAc 共通の作用メカニズムとして, GFAT および TIMP の遺伝子発現レベルを調節する結果, 細胞外基質におけるグリコサミノグリカン量を増加させる可能性が示唆された。また, GlcN 特異的な作用として, 血中エストロゲン濃度を調節する可能性が示唆された。さらに GlcNAc 特異的な作用として, ERK シグナル伝達を抑制する可能性が示唆された。今後, 本実験結果の再現性を異なる手法で検討することが必要である。

グルコサミン研究 4 : 1-8, 2008

keywords

D-グルコサミン塩酸塩, N-アセチル-D-グルコサミン,
DNA マイクロアレイ, 組織メタロプロテアーゼインヒ
ビター

はじめに

D-グルコサミン塩酸塩 (GlcN) および N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) は変形性関節症 (OA) などの関節機能障害の改善に有用であるとされ、現在、健康食品として広く利用されている^{1, 2)}。GlcN および GlcNAc は、細胞外基質におけるグリコサミノグリカン (GAG) の基本構成糖である。したがって、GlcN および GlcNAc の摂取は、グリコサミノグリカンの構成糖として供給され、関節機能障害を改善していると考えられている。しかし、*in vivo* の実験において、GlcN 摂取後の滑膜への GlcN 到達量と比較して、GlcN 摂取における細胞外基質の GAG 量の増加が多く、GAG の構成糖としてのみ GlcN が機能するという説の矛盾が示唆されている⁵⁾。したがって、GlcN および GlcNAc の摂取による関節機能改善作用は、GAG の構成糖となる以外の作用メカニズムがあることが示唆されていた。以前、われわれの軟骨細胞を用いた *in vitro* 実験系において、GlcN は TGF- β の下流にある転写調節因子である Smad 2 および Smad 4 の遺伝子発現レベルを調節し、軟骨細胞の機能を調節することを報告している⁶⁾。また、最近の研究では、GlcNAc がタンパク質の翻訳後修飾に関与することが報告されている⁷⁻⁹⁾。この結果は、GlcN および GlcNAc が生体内において、細胞機能を調節するシグナル分子として作用する可能性を示している。しかし、GlcN および GlcNAc の関節に対する作用メカニズムはいまだ不明な点が多い。

一方、血管内皮細胞などを用いた *in vitro* 実験系において、GlcN および GlcNAc は、ヘキソサミン代謝を亢進させ、2 型糖尿病を悪化させる可能性が多数報告されている¹⁰⁾。また、GlcN および GlcNAc がインスリン抵抗性を惹起させる原因とする報告もある¹¹⁾。しかし、高血圧モデルラットおよび糖尿病モデルマウスを用いた実験系で、GlcN および GlcNAc の摂取は各疾患の発症時期および頻度に影響を与えない結果が報告されている¹²⁾。さらに、ヒト試験において、GlcN および GlcNAc の摂取は、健常者の血糖値に影響を与えなかったことも報告されている^{13, 14)}。したがって、GlcN および GlcNAc の摂取が 2 型糖尿病の発症に与える影響は、いまだ見解の一致がなされていない。

以前、筆者らの軟骨細胞を用いた研究において、GlcN は軟骨細胞の増殖には影響を与えず、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を抑制するが、GlcNAc は軟骨細胞の増殖および ALP 活性に影響を

与えないことを報告している⁶⁾。この結果は、GlcN および GlcNAc 摂取時における生体内の生理作用が両分子で異なる可能性を示唆している。しかし、GlcN および GlcNAc が関節に及ぼす影響および糖尿病発症に及ぼす影響の研究いずれにおいても、両分子は明確に区別されて研究されていない。

筆者らは GlcN および GlcNAc の摂取が *in vivo* に与える影響の共通点および相違点を明らかにすることを目的に実験を行った。本実験においては、マウスを用いて、GlcN および GlcNAc の摂取が代謝の中心点である肝臓の遺伝子発現に与える影響を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、両分子の共通点および相違点を検討した。

I. 方法

1 実験動物

実験動物には、9 週齢 C57BL/6J 雄性マウス (日本クレア社) を用いた。1 週間予備飼育を行った後、コントロール群としてグルコース (Glc) 群、D-グルコサミン塩酸塩 (GlcN) 群、N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) 群の 3 群に無作為に分け、3 週間飼育を行った。飼料は、AIN93-G を基本とし、0.02% の Glc, GlcN, GlcNAc は各々コーンスターチと置換した。摂食時間と摂食エネルギーが同一になるように、ペアフィーディングを行った。飼育終了の 24 時間前に絶食後、6 時間前に飼料を摂取させた。飼料摂取から 4 時間後に屠殺し、肝臓を摘出した。

マウスは恒温恒湿度 (室温 21 ± 1 °C, 湿度 45~50%), 12 時間明暗サイクル (明期: 8:00~20:00) の環境下で飼育を行った。また本実験は、城西大学動物実験指針に基づき、「実験動物の飼育及び保管に関する基準」(昭和 55 年 3 月総理府告示第 6 号) に基づいて行われた。

2 RNA 抽出

肝臓の total RNA は TRIZOL Reagent (Invitrogen 社) を用い抽出した。抽出した total RNA は DPC 処理水に溶解後、分光光度計を用い定量した。さらに、total RNA の質は、A260/A280 比およびアガロースゲル電気泳動を用いて確認した。

3 DNA マイクロアレイ

アレイ間のデータを比較するために、各々のサンプルには、バクテリア由来のコントロールとして、araB, entF, fixB, gnd, hisB, leuB の mRNA を $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 添加した。本実験では、GE Healthcare 社 CodeLink™ Mouse Whole Genome Bioarrays を用い、操作は CodeLink™ のプロトコールに従って行った。cRNA は、 $1 \mu\text{g}$ の total RNA から合成した。合成した 2 本鎖 cDNA は、Qiagen 社 QI Aquick column を用いて精製し、Perkin Elmer 社 T7 RNA polymerase and biotin-11-UTP を用いて cRNA に転写した。cRNA は、Qiagen 社 RNeasy column を用いて精製し、吸光度測定により定量した。 $10 \mu\text{g}$ の cRNA をマグネシウム存在下で、 94°C 、20 分間反応させ断片化し、断片化した cRNA を IGE Healthcare 社 nova 4080 shaking incubator を用いて Mouse Whole Genomic Bioarray に 37°C 、18 時間の条件下でハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、アレイを 46°C の $0.75 \times$ トリスバッファ ($1 \times$ トリスバッファ: 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 7.6, 0.15 mol/L NaCl, 0.05% Tween-20) を用いて 1 時間洗浄した。次に、GE Healthcare 社の streptavidin-Cy5 を用いて、室温暗所で 30 分間標識した。各々のアレイは、 $1 \times$ トリスバッファを用いて 5 分間 2 回の洗浄を行い 0.05% Tween-20 で処理した後、遮光状態を維持し、遠心機を用いて洗浄液を除去した。アレイ上のスポットの標識された蛍光強度を測定するために、Axon GenePix Scanner を用いてアレイスライドのスキャンを行い CodeLink Expression Scanning Software を用いて蛍光強度の画像を構築した。

4 データ解析

各アレイ間のデータは、総強度正規化した。スポットの形状が不良と判定されたもの、スポットの周囲のバックグラウンド領域によごれがみられたもの、スポット内でシグナル強度が飽和したピクセル数の割合が大きいもの、シグナル強度値がバックグラウンドと有意に差が検出されなかったものをフィルタリングし、適正と判定されたスポットのみを解析対象とした。さらに、1 つの遺伝子に対し、複数の転写産物が設定されているデータに関しては、データ傾向が同一であるもののみを信頼できるデータとして扱った。データ解析ツールとしては、KeyMolnet Lite (医薬分子設計研究所) を用いた。

II. 結果

1 検出遺伝子数

全部で 36,227 の転写産物を検出した。スポットの形状が不良と判定されたもの、スポットの周囲のバックグラウンド領域によごれがみられたもの、スポット内でシグナル強度が飽和したピクセル数の割合が大きいもの、シグナル強度値がバックグラウンドと有意に差が検出されなかったものを削除した結果、16,157 の転写産物が解析対象となった。各アレイ間のデータは総強度正規化を用いた。正規化した GlcN および GlcNAc の値を、コントロールである Glc の値で除した。Glc と比較し発現強度が 2 倍以上になった転写産物を発現増加群、Glc と比較し発現強度が $1/2$ 倍以下になった転写産物を発現減少群とした。

発現強度の変動した数を図 1 にまとめた。GlcN で発現が増加した転写産物は、1,598 個検出された。そ

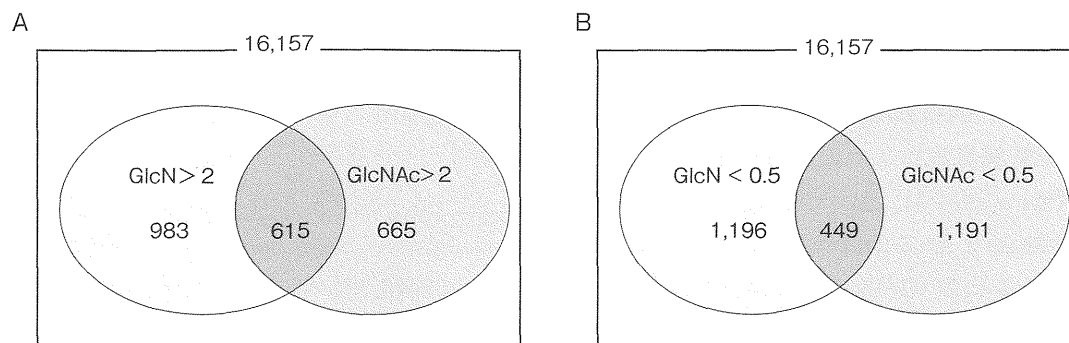


図 1 GlcN および GlcNAc が影響を与えた転写産物数

A : GlcN および GlcNAc で発現レベルが 2 倍以上に増加した転写産物数。

B : GlcN および GlcNAc で発現レベルが 0.5 倍以下に減少した転写産物数。

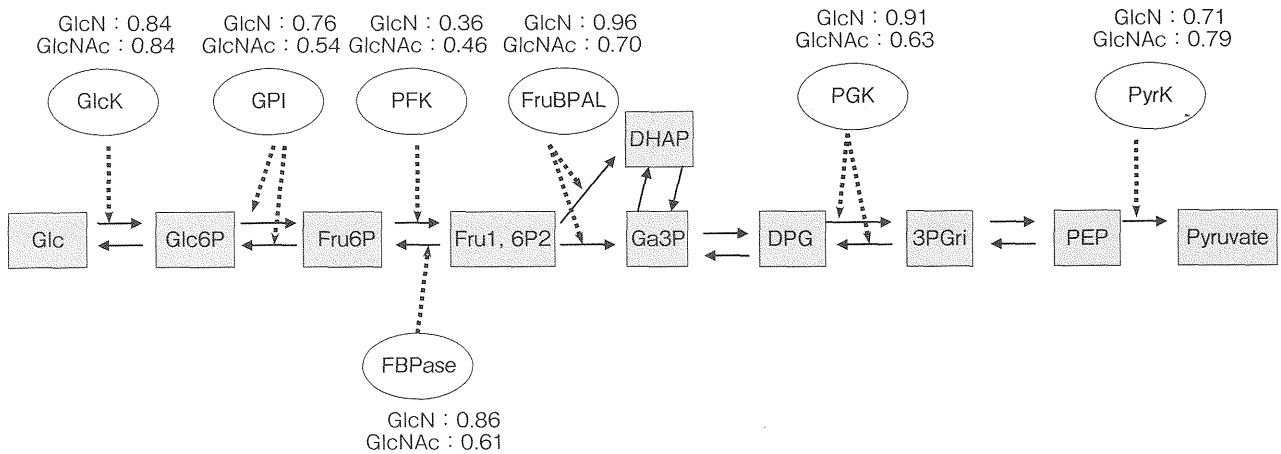


図2 GlcN および GlcNAc が解糖系・糖新生経路に与える影響

GlcN および GlcNAc が解糖系・糖新生の代謝関連酵素の mRNA 発現レベルに影響を及ぼした遺伝子を記した。□は代謝産物、○は酵素とした。○の上下に記した値は、コントロールであるグルコース (Glc) の mRNA 発現レベルと比較した相対値である。

GlcK: グルコキナーゼ (Glucokinase) GPI: グルコース-6-リン酸イソメラーゼ (Glucose phosphate isomerase) PFK: ホスホフルクトキナーゼ (Phosphofructokinase) FruBPAL: フルクトース-1,6-ビスリン酸トリホスリン酸アーゼ (Fructose-bisphosphate aldolase) PGK: ホスホグリセリン酸キナーゼ (Phosphoglycerate kinase) PyrK: ピルビン酸キナーゼ (Phosphoenolpyruvate kinase)

のなかで、GlcN 特異的に発現が増加した転写産物は、983 個であった。一方、GlcNAc で発現が増加した転写産物は、1,280 個検出された。そのなかで、GlcNAc 特異的に発現が増加した転写産物は、665 個であった。また、GlcN および GlcNAc 共通で発現が増加した転写産物は、615 個であった。

GlcN で発現が減少した転写産物は、1,645 個検出された。そのなかで、GlcN 特異的に発現が減少した転写産物は、1,196 個であった。一方、GlcNAc で発現が減少した転写産物は、1,640 個検出された。そのなかで、GlcNAc 特異的に発現が減少した転写産物は、1,191 個であった。また、GlcN および GlcNAc 共通で発現が減少した転写産物は、449 個であった。

2 グルコサミンおよび N-アセチルグルコサミンが糖代謝に与える影響

GlcN および GlcNAc が糖代謝に与える影響を検討した。はじめに、解糖系に関係する酵素の転写産物発現レベルを検討した。その結果、glucokinase (GlcK) の発現レベルは、Glc と比較して、GlcN および GlcNAc はともに 0.84 倍だった。glucose 6-phosphate isomerase (GPI) の発現レベルは、Glc と比較して、GlcN で 0.76 倍、GlcNAc は 0.54 倍だった。6-phosphofructokinase (PFK) の発現レベルは、Glc と比較して、GlcN で 0.36 倍、GlcNAc は 0.46 倍だった。fructose-bisphosphate (FruBPAL) の発現レベルは、

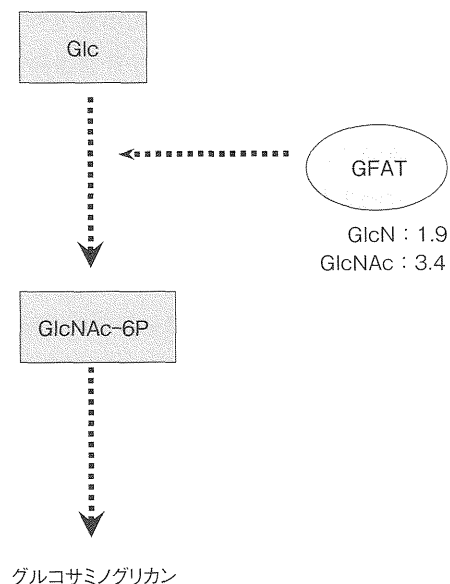


図3 GlcN および GlcNAc が GAG 合成系に与える影響

GlcN および GlcNAc がグリコサミノグリカン合成経路の代謝関連酵素の mRNA 発現レベルに影響を及ぼした遺伝子を記した。

GFAT: グルコサミン-フルクトース-6-リン酸アミノトランスフェラーゼ (Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase)

Glc と比較して、GlcN で 0.96 倍、GlcNAc は 0.70 倍だった。phosphoglycerate kinase (PGK) の発現レベルは、Glc と比較して、GlcN で 0.91 倍、GlcNAc は 0.63 倍だった。pyruvate kinase (PyrK) の発現レベルは、Glc と比較して、GlcN で 0.71 倍、GlcNAc は 0.79 倍だった。

表1 GlcN および GlcN 共通で発現が増加した遺伝子

遺伝子名	fold change (GlcN/Glc)	fold change (GlcNAc/Glc)
transglutaminase 6 (TG6)	8.9	29.3
transglutaminase 4 (TG4)	3.4	3.7
Insulin-like growth factor 2	3.1	4.5
tissue inhibitor of metalloprotease-1 (TIMP-1)	7.9	6.5
tissue inhibitor of metalloprotease-2 (TIMP-2)	3.1	3.2

表2 GlcN 特異的に発現が増加した遺伝子

遺伝子名	fold change (GlcN/Glc)	fold change (GlcNAc/Glc)
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1F (HTR1b)	30	0.5
interleukin 17 recptor B (Il17rb)	20.9	0.8
guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 3 (Gnai3)	12.6	0.8
Interleukin 17A (Il17a)	7.4	0.5
proliferin related protein (Plfr)	7.3	1
chemokine (C-X-Cmotif) receptor 4 (C xcr4)	5.6	0.8
hydroxysteroid (17-beta)dehydrogenase 1 (Hsd17b1)	4	0.5
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1D (Htr1d)	3.7	0.9
phosphodiesterase 10A (Pde10a)	2.6	1.5
hydroxysteroid (17-beta)dehydrogenase 3 (Hsd17b3)	2.3	0.4
guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3 subunit (Gnd3)	2.2	0.8
inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1 (Itpr1)	2.2	0.8

表3 GlcNAc 特異的に発現が減少した遺伝子

遺伝子名	Fold change (GlcN/Glc)	Fold change (GlcNAc/Glc)
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta (Cebpb)	1.0	0.2
FBJ osteosarcoma oncogene (c-FOS)	1.0	0.3
V-raf-leukemia viral oncogene-1 (Raf1)	0.9	0.5
Nuclear receptor coactivator 1	0.9	0.5
Apolipoprotein A-I (Apoa1)	0.9	0.5

た、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, phosphoglyce rate mutase, enolase の mRNA 発現レベルは、Glc, GlcN, GlcNAc の 3 群間で相違はなかった。次に糖新生に与える影響を検討した。その結果、糖新生の律速酵素である fructose-1, 6-bisphosphatase (FBPase) の値は、GlcN は 0.86 倍、GlcNAc は 0.61 倍だった。

次に、解糖系および糖新生以外の糖代謝関連遺伝子において、GlcN および GlcNAc で増加している遺伝子を検索した。その結果、GAG 代謝経路において、glutamine fructose-6-phosphale amido transferase (GFAT) の値が、GlcN は Glc の 1.9 倍、GlcNAc は Glc の 3.4 倍だった。

3 | グルコサミンおよび N-アセチルグルコサミン共通に発現が変動した遺伝子群

GlcN および GlcNAc が Glc と比較して発現レベルが変動した遺伝子を検索した。その結果、Glc と比較した transglutaminase 6 の相対値は、GlcN は 8.9、GlcNAc は 29.3、transglutaminase 4 の相対値は、GlcN は 3.4、GlcNAc は 3.7 だった。また、インスリン様成長因子-2 (insulin-like growth factor-2, IGF-2) の相対値は、Glc と比較して GlcN が 3.1 倍、GlcNAc は 4.5 倍だった。さらに、組織メタプロテアーゼインヒビター-1 (tissue inhibitor of metalloprotease-1, TIMP-1) の相対値は、GlcN は 7.9 倍、GlcNAc は 6.5 倍となり、TIMP-2 の相対値は、GlcN は 3.1 倍、GlcNAc は 3.2 倍だった。

4 | グルコサミン特異的に発現が変動した遺伝子群

GlcN 特異的に発現レベルが増加した遺伝子群を表 2 に示した。その結果、17 β -hydroxysteroid dehydrogenase-1 (Hsd17b1) と 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase-3 (Hsd17b3) の Glc と比較した相対値は、GlcN は 4 倍と 2.3 倍、GlcNAc は 0.5 と 0.4 倍となり、GlcN のみで顕著に発現レベルが増加した。また、guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting-3 (Gnai3) および guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3 subunit (Gnd3) の Glc と比較した相対値が、GlcN は 12.6 倍と 2.2 倍、GlcNAc は 0.8 と 0.8 倍となり、GlcN のみで顕著に発現レベルが増加した。

5 | N-アセチルグルコサミン特異的に発現が変動した遺伝子群

GlcNAc 特異的に発現レベルが減少した遺伝子群を表 3 に示した。その結果、FBJ osteosarcoma oncogene (c-Fos) の Glc と比較した相対値は、GlcN は 1.0 倍、GlcNAc は 0.3 となり、GlcNAc のみで顕著に発現レベルが減少した。また、V-raf-leukemia viral oncogene-1 (Raf1) の Glc と比較した相対値が、GlcN は 0.9 倍、GlcNAc は 0.5 倍となり、GlcNAc のみで顕著に発現レベルが減少した。Raf の下流遺伝子を検討した。その結果、mitogen-activated protein kinase kinase-1 (MEK1) の Glc と比較した相対値が GlcN は 1.1 倍、GlcNAc は 0.7 倍であった。extracellular signal-regulated protein kinase (ERK1) の Glc と比較した相対値は、GlcN は 0.8 倍、GlcAc は 0.6 倍であった。calnexin の Glc と比較した相対値は、GlcN は 0.8 倍、GlcAc は 0.6 倍であった。腫瘍壊死因子受容体-1 (tumor necrosis factor receptor-1, TNFR1) の Glc と比較した相対値は、GlcN は 0.8 倍、GlcAc は 0.7 倍であった。p90RSK2 の Glc と比較した相対値は、GlcN は 0.9 倍、GlcAc は 0.7 倍であった。nuclear receptor coactivator-2 (NCOA2) の Glc と比較した相対値は、GlcN は 0.9 倍、GlcAc は 0.5 倍であった。

Ⅲ. 考 察

GlcN および GlcNAc は、関節軟骨の重要な構成成分である GAG の基本構成糖であることから、OA を含む関節機能障害の改善に有用であるとされ、現在、

健康食品として広く利用されている^{1, 2)}。GlcN および GlcNAc は、細胞内においてグルコースから GAG への代謝経路を共有することから、同一の生理作用を有する分子であると考えられてきた。しかし、われわれは、軟骨細胞株 ATDC5 を用いた実験において、GlcN は軟骨細胞のアルカリフォスファターゼ活性を抑制するが、GlcNAc は活性に影響を与えないことを報告している⁶⁾。この結果は、健康食品としての GlcN と GlcNAc は、異なる作用を有する可能性が高いことを示唆している。

本実験では、DNA マイクロアレイを用いて、GlcN および GlcNAc 摂取時の遺伝子発現レベルを比較した結果、GlcN および GlcNAc は、Glc と比較して各々約 3,000 の転写産物の発現を顕著に変動させた。この結果は、GlcN および GlcNAc は GAG の基本構成糖の材料となるのみならず、生体調節分子として機能することを示している。また、GlcN および GlcNAc 摂取後における肝臓の遺伝子発現は、共通の発現変動と各々の分子で特異的な発現変動の両面を有することが明らかとなった。すなわち、GlcN および GlcNAc 摂取によって得られる作用は、共通する点と各々の分子特異的な作用があることを遺伝子レベルで明らかにした。

GlcN および GlcAc は、関節軟骨において、ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸量を増加させることが報告されている。われわれは、以前、軟骨細胞株 ATDC5 を用いた実験において、GlcN が軟骨細胞外基質におけるコンドロイチン硫酸量を増加させることを報告している。本実験の結果、GlcN および GlcNAc で共通し発現レベルが変動した遺伝子として、GFAT を検出した。GFAT は、グルタミンとフルクトース-6-リン酸から、グルタミン酸とグルコサミン-6-リン酸を合成する酵素である¹⁵⁾。生体内において、GlcN および GlcNAc は、グルコースからフルクトース-6-リン酸を経由して合成される。本実験の結果から、摂取された GlcN および GlcNAc は、GAG の基本構成糖になるのみならず、GlcN および GlcNAc 合成経路の代謝を亢進し、GAG の合成を促進させる可能性が示唆された。さらに、GlcN と GlcNAc は、TIMP の発現レベルを増加させた。TIMP は、タンパク質を分解する酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼのインヒビターである^{16, 17)}。本実験の結果、GlcN および GlcNAc は TIMP の発現レベルを増加させ、GlcN および GlcNAc は、細胞外基質の合成促進のみではなく、GAG の分解を抑制し、(細胞外基質の) GAG 量

を増加させる可能性が示唆された。

本実験の結果、GlcNのみで発現レベルが増加した遺伝子として、Hsd17bに着目した。Hsd17bは、主に肝臓において、エストラジオールをエストロンに相互変換させる酵素である¹⁸⁾。変形性関節症(OA)は、女性の発症率が男性と比較して高いことが報告されている¹⁹⁾。GlcNがHsd17bの発現レベルを増加させた結果から、GlcNの摂取によるOAの症状改善作用のメカニズムとして、GlcNの血中のエストロゲンレベルを調節作用が関与する可能性が示唆された。本実験は、雄性マウスを用いた実験であるため、今後、雌性マウスを用いて詳細に検討する必要がある。また、女性ホルモンが関与する疾患への影響についても、今後、検討することが望まれる。

また、Gnai 3およびGnd 3などのGタンパク質の遺伝子発現レベルがGlcNのみで増加していた。Gタンパク質は、Gタンパク質共役受容体にリガンドが結合することによって活性化し、細胞内においてセカンドメッセンジャーとして機能する²⁰⁾。本実験の結果、GlcN特異的なシグナル伝達系が存在し、Gタンパク質共役受容体を介し、標的細胞の機能を調節する可能性が示唆された。

c-FosおよびRaf1はGlcNAc特異的に発現レベルが減少した。c-Fosは、シグナル伝達調節因子の1つであり、疼痛時に発現が増加することが報告されている^{21, 22)}。c-Fosは、上流のRafが活性化し、MEKカスケードを介し、その下流にある種々の転写を調節する^{23, 24)}。本実験の結果、Rafの下流にあるMEKカスケードとその下流にある複数の遺伝子の発現レベルがGlcNAcで減少傾向を示した。この結果は、GlcNAcによる関節の疼痛緩和作用は、Rafシグナル伝達経路の抑制である可能性が示唆された。今後、軟骨細胞の炎症モデルなどを利用して、検討することが必要である。

本実験において、GlcNおよびGlcNAcが糖代謝に与える影響を検討した結果、解糖系に関与する6つの酵素のmRNA発現レベルが低下傾向を示した。その中において、GlcK、PFKは糖尿病に関与する酵素として知られている。一方、糖新生系における主要エンザイムであるFBPaseも低下傾向を示した。

GlcNおよびGlcNAcは、*in vitro*の実験系において、ヘキソサミン代謝が亢進し、解糖系が抑制することが報告されている。また、インスリン抵抗性を惹起することも報告されている。これらの報告から、GlcNおよびGlcNAcの摂取は2型糖尿病を誘導する可能性

が示唆されていた。一方、*in vivo*の実験系において、通常マウスにおけるGlcNの摂取は、マウスの空腹時血糖値に影響を与えないことが報告されている。さらに、高血圧自然発症モデルラットおよび2型糖尿病モデルマウスにおいて、GlcNの摂取はこれら疾患モデル動物の症状を悪化させないことも報告されている。今回のわれわれの実験結果から、解糖系および糖新生の両経路のmRNAレベルが抑制されたことから、血糖値の上昇および下降のどちらにも代謝が誘導されていない可能性が示された。すなわち、通常マウスにおいて、GlcNおよびGlcNAcの摂取は、血糖値に影響を与えないことをmRNAレベルで示した。

以上、筆者らは、GlcNおよびGlcNAcの摂取による生体への影響は、共通作用と特異的作用があることを遺伝子レベルで明らかにした。GlcNおよびGlcNAc共通の作用メカニズムとして、GFATおよびTIMPの遺伝子発現レベルを調節する結果、細胞外基質におけるグリコサミノグリカン量を増加させる可能性が示唆された。また、GlcN特異的な作用として、血中エストロゲン濃度を調節する可能性が示唆された。さらにGlcNAc特異的な作用として、ERKシグナル伝達を抑制する可能性が示唆された。本実験の結果は、GlcNおよびGlcNAc摂取時における肝臓のmRNAレベルを通常マウスで示したものであるため、今後、リアルタイムPCRなどを用いてmRNAの定量をするとともに、個々の事象をタンパク質レベルおよび個体レベルで検討することが望まれる。

◆参考文献

- 1) Gregory PJ, Sperry M, Wilson AF : Dietary supplements for osteoarthritis. *Am Fam Physician* 77 : 177-184, 2008
- 2) Bruyere O, Reginster JY : Glucosamine and chondroitin sulfate as therapeutic agents for knee and hip osteoarthritis. *Drugs Aging* 24 : 573-580, 2007
- 3) Wusteman FS, Gillard GC : Hyaluronic acid in elastic cartilage. *Experientia* 33 : 721-723, 1977
- 4) Otsuki S, et al : Hyaluronic acid and chondroitin sulfate content of osteoarthritic human knee cartilage : site-specific correlation with weight-bearing force based on femorotibial angle measurement. *J Orthop Res* 2008
- 5) Laverty S, Sandy JD, Celeste C, Vachon P, Marier JF, Plaas AH : Synovial fluid levels and serum pharmacokinetics in a large animal model following treatment with oral glucosamine at clinically relevant doses. *Arthritis Rheum* 52 : 181-191, 2005

- 6) Nakatani S, Mano H, In R, Shimizu J, Wada M: Glucosamine regulates differentiation of a chondrogenic cell line, ATDC5. *Biol Pharm Bull* 30 : 433-438, 2007
- 7) Iyer SP, Hart GW : Dynamic nuclear and cytoplasmic glycosylation : enzymes of O-GlcNAc cycling. *Biochemistry*, 42 : 2493-2499, 2003
- 8) Slawson C, Housley MP, Hart GW : O-GlcNAc cycling : how a single sugar post-translational modification is changing the way we think about signaling networks. *J Cell Biochem* 97 : 71-83, 2006
- 9) Wells L, Hart GW : O-GlcNAc turns twenty : functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. *FEBS Lett* 546 : 154-158, 2003
- 10) Duan W, Paka L, Pillarisetti S : Distinct effects of glucose and glucosamine on vascular endothelial and smooth muscle cells : evidence for a protective role for glucosamine in atherosclerosis. *Cardiovasc Diabetol* 4 : 16, 2005
- 11) Buse MG : Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes : current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290 : E1-E8, 2006
- 12) Echard BW, et al : Effects of oral glucosamine and chondroitin sulfate alone and in combination on the metabolism of SHR and SD rats. *Mol Cell Biochem*, 225 : 85-91, 2001
- 13) Anderson JW, Nicolosi RJ, Borzelleca JF : Glucosamine effects in humans : a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy. *Food Chem Toxicol* 43 : 187-201, 2005
- 14) Tannis AJ, Barban J, Conquer JA : Effect of glucosamine supplementation on fasting and non-fasting plasma glucose and serum insulin concentrations in healthy individuals. *Osteoarthritis Cartilage* 12 : 506-511, 2004
- 15) Lagranha CJ, Doi SO, Pithon-Curi TC, Curi R, Sellitti DF : Glutamine enhances glucose-induced mesangial cell proliferation. *Amino Acids* 34 : 683-685, 2008
- 16) Fu X, Parks WC, Heinecke JW : Activation and silencing of matrix metalloproteinases. *Semin Cell Dev Biol* 19 : 2-13, 2008
- 17) Hemmann S, et al : Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis : a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol* 46 : 955-975, 2007
- 18) Blomquist CH : Kinetic analysis of enzymic activities : prediction of multiple forms of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55 : 515-524, 1995
- 19) Hanna FS, Wluka AE, Bell RJ, Davis SR, Cicuttini FM : Osteoarthritis and the postmenopausal woman : epidemiological, magnetic resonance imaging, and radiological findings. *Semin Arthritis Rheum* 34 : 631-636, 2004
- 20) Vazquez-Juarez, E, Ramos-Mandujan G, Hernández-Benitez R, Pasantes-Morales H : On the role of G-protein coupled receptors in cell volume regulation. *Cell Physiol Biochem* 21 : 1-14, 2008
- 21) Birkedal-Hansen H : Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res* 28 (6 Pt 2) : 500-510, 1993
- 22) Munglani R, Hunt SP : Molecular biology of pain. *Br J Anaesth* 75 : 186-192, 1995
- 23) Davis RJ : Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev* 42 : 459-467, 1995
- 24) Yordy JS, Muise-Helmericks RC : Signal transduction and the Ets family of transcription factors. *Oncogene* 19 : 6503-6513, 2000